Einbau von ^{131}J-Desoxyuridin in die DNA der Lymphatischen Zellen der Ratte unter dem Einfluß von Phytohaemagglutinin und Zytostatika in vivo

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Hans-Joachim Schroth

Saarbrücken

1973

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik (Innere Medizin I)
Direktor: Prof. Dr. med. P. G. S c h e u r l e n

und aus der Abteilung für Nuklearmedizin und Medizinische
Physik der Universität des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. E. O b e r h a u s e n

---

Einbau von ^{131}J-Desoxyuridin in die DNA der Lymphatischen Zellen der Ratte unter dem Einfluß von Phytohaemagglutinin und Zytostatika in vivo

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde

der

H O H E N M E D I Z I N I S C H E N F A K U L T Ä T
D E R U N I V E R S I T Ä T D E S S A A R L A N D E S

vorgelegt von

H a n s - J o a c h i m S c h r o t h

1973

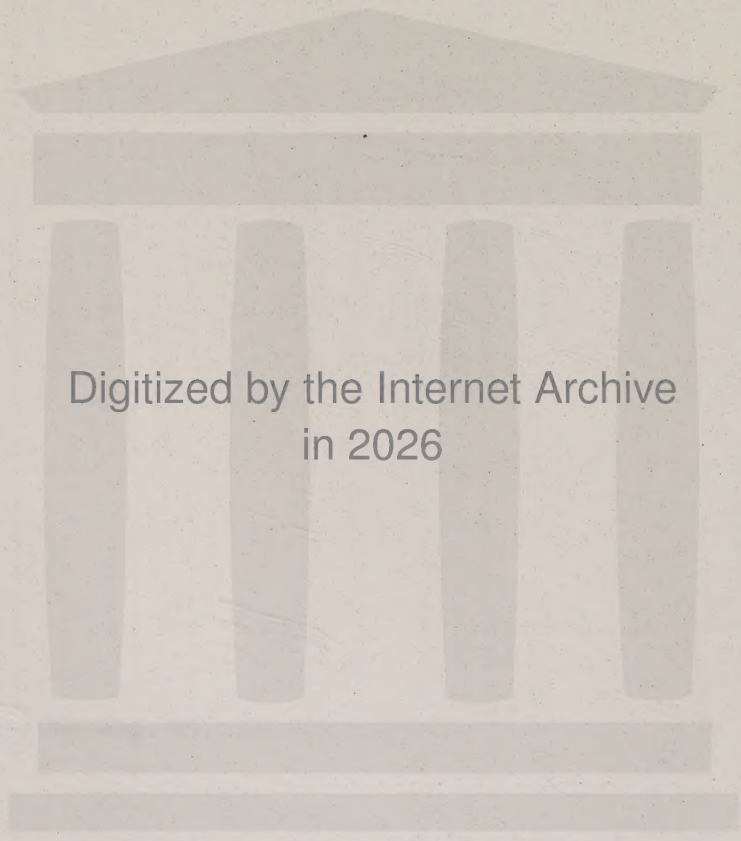
Dekan: Prof. Dr. med. G. A. J u t z l e r
Referent: Prof. Dr. med. A. P a p p a s

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mündliche Prüfung: 21. Dezember 1973

Meiner Frau

gewidmet


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41542725_0065

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. Einleitung

1.1 Immunantwort im Lymphatischen System 1

1.2 Eigenschaften des Phytohaemagglutinins (PHA) 3

1.3 Fragestellung der Arbeit 4

2. Material und Methode

2.1 Verwendete Tiere und Substanzen 6

2.2 Messgeräte 9

2.3 Kalibrierung der Messgeräte 11

2.4 Verlauf der Zeit-Aktivitäts-Kurven in Abhängigkeit von der Vorbehandlung mit Jodid 11

3. Durchgeführte Untersuchungen

3.1 Versuche zur Dosierung von ^{131}JDU und zur Proliferationskinetik 13

3.2 Vergleich der Kombinationsmedikation von VINCRISTIN ^{R} und ENDOXAN ^{R} mit Phytohaemagglutinin und ENDOXAN ^{R} 14

3.3 Statistische Auswertung

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Ergebnisse der Versuche zur Proliferationskinetik 17

4.1 Ergebnisse der Versuche zur Kombinationsmedikation von ENDOXAN R, VINCRISTIN R und PHA 2o

4.2 Diskussion der Versuchsdurchführung und der Ergebnisse 25

5. Zusammenfassung 34

6. Abbildungen 35

7. Literaturverzeichnis 36

8. Anhang 46

9. Lebenslauf 49

1o. Danksagung 5o

1. Einleitung

1.1 Immunantwort im Lymphatischen System

Die Phylogenese der Immunantwort reicht von der einfachen Phagozytose bis hin zur Entwicklung hochdifferenzierter Abwehrmechanismen. Auf diesem Weg findet sich die Erscheinung der spezifischen Immunantwort dort zum ersten Mal, wo die Entwicklung der Thymusdrüse beginnt. Die immunologisch kompetenten Zellen sind bei den kleinen Lymphozyten zu suchen, die sich von undifferenzierten Stammzellen ableiten. Während der Fetalzeit sind diese in der Leber und im Knochenmark, später nur noch im letzteren zu finden (Übersicht bei HUMPHREY und WHITE, 1971).

Die kleinen Lymphozyten stellen keine einheitliche Zellpopulation dar. Ein Teil nimmt seinen Weg von der Stammzelle über die Thymusdrüse und differenziert sich dort zu Lymphozytenvorstufen, aus denen durch rasche Teilungen kurzlebige Lymphozyten entstehen. Diese verlassen teilweise den Thymus wieder, um als T-Lymphozyten in die lymphatischen Gewebe einzuwandern. Der andere Teil der Lymphozyten differenziert sich unabhängig vom Thymus aus der Stammzelle und wird als B-Lymphozyten bezeichnet. Beide Populationen beinhalten Zellen, die durch Antigene zu sensibilisieren sind und spezifische Antikörper an ihrer Zelloberfläche tragen.

Die B-Lymphozyten besiedeln weitgehend die lympha-

tischen Gewebe. Sie sind teilungsfähig und differenzieren sich zu Plasmazellen, die humorale Antikörper bilden. Jeder Defekt, der die Zahl oder die Ausdifferenzierung der B-Lymphozyten beeinflußt, führt zu einer fehlerhaften Immunglobulinsynthese.

Die T-Lymphozyten stellen den größten Teil der zirkulierenden kleinen Lymphozyten dar. Ihre Stimulation mit spezifischen Antigenen führt zu einer Population antigen-sensibilisierter Zellen, die das immunologische Gedächtnis darstellen (Memory Cells). Diese Tatsache setzt auch ihre lange Überlebenszeit voraus, die sie nach Verlassen der Thymusdrüse mit charakterisiert. Der zytotoxische Effekt von T-Lymphozyten auf Transplantatzellen ist ein Teil der immunologischen Grundlagen der Transplantatabstoßung.

Die T-Lymphozyten setzen eine Reihe von Faktoren frei, die auf andere Lymphozyten mitogen wirken und die Gefäßpermeabilität steigern.

Sie wirken mit bei der Immunantwort auf bestimmte thymusabhängige Antigene im Sinne einer Stimulation der B-Lymphozyten zur Antikörperproduktion. Kommt es darum nicht zur Bildung eines suffizienten T-Systems, führt dies zu einem Defekt der zellulären Immunität wie auch zu einem Mangel an humoralen Antikörpern (FUNDENBERG et al., 1970).

Neben dieser spezifischen Stimulation der T-Lymphozyten kennen wir eine unspezifische durch Mitogene, zu denen

Phytohaemagglutinin gehört. Sie transformieren T-Lymphozyten und möglicherweise ein Teil der B-Lymphozyten in vitro wie auch in vivo zu blastenartigen pyroninophilen Zellen (NOWELL, 1960; GREAVES et al., 1968; HUMPHREY und WHITE 1971) und steigern die Mitoserate (BISHUN et al., 1965; MACHADO und LOZZIO, 1968; LOZZIO et al., 1969; HUMPHREY und WHITE, 1971; SCARO et al., 1971; PAPPAS et al., 1972).
Diesen Einfluß des Phytohaemagglutinins auf das lymphatische System haben frühere Versuche morphologisch bestätigt (PAPPAS et al., 1972).

1.2 Eigenschaften des Phytohaemagglutinins (PHA)

PHA ist ein Extrakt aus phaseolus vulgaris, das erythroagglutinierende, leukoagglutinierende und mitogene Eigenschaften besitzt. Das Molekulargewicht der Substanz beträgt etwa 128000. Elektrophoretisch lässt sie sich bei pH 2 in ein inaktives Polysaccharid und in ein haemagglutinierendes Euglobulin auftrennen (RIGAS et al., 1955, 1966). Der gereinigte Extrakt wurde mittels Gelfiltration in weitere 10 - 12 Einheiten unterschiedlicher physiko-chemischer Eigenschaften aufgegliedert (PAPPAS et al., 1971).
Für die Beurteilung der biologischen Wirksamkeit von PHA bei in vivo Versuchen ist es von Interesse, das Substanzengemisch in diejenigen Komponenten auf-

zutrennen, denen jeweils eine der oben genannten Eigenschaften zuzuordnen ist. Die erythroagglutinierenden Eigenschaften sind durch einmalige Absorption von PHA an Erythrozyten zu beseitigen (GAMBLE, 1966; RIGAS et al.,.1966).
Schwieriger hingegen ist die Auftrennung der leukoagglutinierenden und mitogenen Eigenschaften, von denen die letzteren im Rahmen der vorliegenden Arbeit bedeutsam sind. Bei dem zur Verfügung stehenden Präparat der Firma Wellcome, Butch No. PHA/676/8o/B, enthalten 1o mg des Proteins 94 "Wellcome" Einheiten an mitogener Aktivität und 493 "Wellcome" Millieinheiten haemagglutinierender Komponenten.
RIGAS et al., 1966 haben den mitogenen Einfluß von PHA in Abhängigkeit von der Zeit auf Kulturen von Blut-Lymphozyten getestet. Als Parameter geben sie die Mitoseraten und die Einlagerung von ^{3}H-Uridin in die DNA an. Ein Mitosegipfel wird 72 Stunden nach Zusatz von PHA, ein Gipfel der Einlagerung von radioaktiv markiertem Uridin nach 5o Stunden beschrieben.

1.3 Fragestellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist:

a) den quantitativen Nachweis von DNA-Synthese und DNA-Verlust in vivo durch Markierung der DNA mit ^{131}J-Desoxyuridin (^{131}JDU) methodisch zu er-

arbeiten,

b) die Darstellung der Proliferationskinetik des lymphatischen Systems unter dem mitogenen Einfluß von Phytohaemagglutinin,

c) die Prüfung der Möglichkeit einer zytostatischen Synchronisationstherapie mit PHA im Vergleich mit der in der Klinik durchgeführten Kombination von VINCRISTIN ^{R} und ENDOXAN ^{R}.

2. Material und Methode

2.1 Verwendete Tiere und Substanzen

Tiere

Für die Versuche wurden 235 weibliche Sprague-Dawley Ratten verwendet. Die 150 - 250 g schweren Tiere wurden im Broekmann Institut, Helmond-Stipmont, Holland gezüchtet. Die Tiere der Kollektive A - C erhielten reines Trinkwasser, die Versuchsgruppen D - I sieben Tage vor Versuchsbeginn und während der gesamten Versuchsdauer als Trinkwasser eine 2%ige Natrium-Jodid-Lösung, um die spätere Einlagerung von ^{131}J in die Schilddrüse zu verhindern. Dem Kollektiv F_1 wurde eine 4%ige NaJ-Lösung als Trinkwasser gegeben. Die Tiere bekamen Futter und Trinkwasser im Überschuß.
Eine Aufstellung der Versuchsgruppen, sowie ein Zeitplan der Versuche findet sich im Anhang.

Phytohaemagglutinin
Hersteller: Deutsche Wellcome GmbH
Als mitogene Substanz wurde Phytohaemagglutinin - Purified Wellcome angewendet, Butch-Nr. 676/80/B
Die Dosierung von PHA mit 5 mg/kg Körpergewicht, gelöst in 2 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung, orientierte sich an der LD_{50}, die für Sprague-Dawley-Ratten bei 8,8 mg/kg Körpergewicht liegt (PAPPAS et al., 1972).

^{131}J-Desoxyuridin

Hersteller: Radiochemical Centre, Amersham, England

Markiert wurde die DNA mit 5-Jod-2'-Desoxyuridin, das entsprechend dem Thymidin während der S-Phase selektiv in die DNA eingebaut wird. ^{131}JDU, das infolge von Zelluntergang freigesetzt wird, findet im Organismus keine Wiederverwendung (HUGHES, 1964; FEINDEGEN et al., 1966). Mit einer biologischen Halbwertszeit von 2 - 3 Minuten wird ^{131}JDU durch die Leber dehalogeniert und als Jodid über die ausgeschieden, bzw. von der Schilddrüse aufgenommen (ERTL, 197o; PITTNER 1971).

Die Analyse des Herstellers vom 11.2.1972:

Spez.-Aktivität	:	9,9 mCi/mg
Radioaktive Konzentration	:	o,25 mCi/ml
Mol.-Gewicht	:	354,1

^{131}J hat eine Halbwertszeit von 8,o5 Tagen. Die Korrektur des radioaktiven Zerfalls erfolgte nach der Formel:

$$N_{(t)} = N_{(o)} \cdot e^{-\lambda t}$$

t = Zeit in Stunden nach Injektion von ^{131}JDU

$N_{(t)}$, $N_{(o)}$ = Impulsraten zum Zeitpunkt T = O, bzw. T = t

λ = Zerfallskonstante von ^{131}J

Die Dosierung von ^{131}JDU lag bei ca. 1o µCi pro Tier, etwa einer Aktivität von 5o nCi/g Körpergewicht Ratte entspricht.

Diese Aktivitäten konnten mit dem verwendeten Ganzkörperzähler noch ohne Zählverluste bei t = o registriert werden.

ENDOXAN ^{R} (Cyclophosphamid)
Hersteller: Asta-Werke AG, Brackwede/Westf.
Als alkylierende Substanz wurde Cyclophosphamid (N, N-Bis-2-chloräthyl -) N', o-propylenphosphorsäurediamid) verabreicht. Bei dieser Substanz handelt es sich um eine N-Lost-Gruppe, die durch Bindung an Phosphorsäure reversibel inaktiviert ist (DRUCKREY et al., 1963).
ENDOXAN ^{R} wurde in einer Dosis von 52,5 mg/kg i.v. injiziert, was 25 % der LD_{50} für Sprague-Dawley-Ratten entspricht. Die biologische Halbwertszeit der zytostatisch wirksamen Substanz beträgt 15 min (DRUCKREY et al., 1963). Alkylierende Substanzen, auch Proliferationsgifte genannt (BROCK, 1961), sind in der Lage, die Doppelhelix der DNA bevorzugt über zwei Guaninbasen zu vernetzen, was zu einer Hemmung der Zellteilung im Sinne einer gestörten DNA-Reduplikation führt (SCHMIDT, 1967; HARBERS, 1969; BROCK und SCHNEIDER, 1971).
Ihr Einfluß auf die enzymatische DNA-Synthese wird unterschiedlich beurteilt (HARBERS, 1969; GERHARDS und GRAUL, 1971). Aus Versuchen über die Wirkung von ENDOXAN ^{R} auf den subcutan wachsenden Jensen-Tumor bei Ratten gibt SCHMIDT einen Stillstand des Tumor-

wachstums 48 Stunden nach Injektion von 7o mg ENDOXAN ^{R}/kg an.

VINCRISTIN ^{R}

Hersteller: Eli Lilly GmbH, Giessen

VINCRISTIN ^{R} ist ein Alkaloid aus Vinca rosea mit folgender Summenformel: $C_{46}\ H_{54}\ N_4\ O_{1o} \cdot H_2\ SO_4$. Die LD_{5o} wird für intravenöse Applikation bei Ratten mit 2 mg/kg Körpergewicht angegeben (NEUSS et al., 1962). Wie bei ENDOXAN ^{R} wurden in den Versuchen 25 % der LD_{5o} i.v. verabreicht. Der Zeitabstand zwischen der Injektion von VINCRISTIN ^{R} und ENDOXAN ^{R} betrug 48 Stunden. Der genaue Wirkungsmechanismus von VINCRISTIN ^{R} ist nicht bekannt. EUGENIG und OBRECHT, 1968, diskutieren eine irreversible Mitosenblockade im Stadium der Metaphase. Die Konzentration des zytostatisch wirksamen Alkaloids im Blut steigt bis zu einem Gipfel nach einer Stunde steil an, um ebenso steil wieder abzufallen. Nach 24 Stunden sind noch etwa 2o % der biologisch wirksamen Substanz vorhanden (MORASCA et al., 1966). Verstoffwechselt wird VINCRISTIN ^{R} in der Leber (BEER, 1961).

2.2 Meßgeräte

a) Ganzkörperzähler

Es wurde ein Gerät der Firma Packad mit flüssigem Szintillator verwendet. Gemessen wurde mit inte-

graler Einstellung, wobei der Diskriminator unterhalb des Bereichs des Comptoneffektes von ^{131}J eingestellt war. Dadurch ergibt sich ein günstiges Verhältnis zwischen Nutz- und Nulleffektimpulsen. Abb. 1 zeigt das Impulshöhenspektrum von ^{131}J und Abb. 2 das des Nulleffekts. Es bestand eine lineare Abhängigkeit von Aktivität und Impulsraten von etwa 25 µCi an abwärts (Abb. 3). Die Konstanz des Detektors und der nachfolgenden Elektronik wurde durch Vergleich von errechnetem und gemessenem Aktivitätsverlust eines ^{131}JDU-Standards überwacht (Abb. 4). Zur Ermittlung der Orte gleicher Messintensität wurde eine Plexiglasschablone angefertigt, die in ihren Ausmaßen dem Durchmesser und der Tiefe des Messzylinders entsprach (16 x 7 cm) und 9 x 21 symetrisch angeordnete Bohrlöcher im Abstand von o,5 cm besaß. In jedem Bohrloch wurde ein Stöpsel mit ^{131}J gefüllt gemessen und die Messwerte jedes Bohrloches als °/oo der maximalen Impulsrate (276453 Imp/o,1 Min) ausgerechnet. Die Ergebnisse wurden graphisch ausgewertet (Abb. 5). Die durch die Geometrie der Messanordnung möglichen Messwertschwankungen wurden durch Fixieren der Ratte während der Messzeit in der Mitte des Messzylinders ausgeschlossen.

b) Automatischer Probenwechsler von Siemens

Die Konstanz dieser Messanordnung wird durch einen Ba-Standard überprüft.

2.3 Kalibrierung der Messgeräte

Zum Vergleich von Ganzkörpermessung und organspezifischer Aktivitätsmessung durch den Probenwechsler von Siemens war es erforderlich, Impulsraten gleicher Aktivitäten, durch jeweils beide Messanordnungen ermittelt, miteinander zu vergleichen. 1o µCi wurden mit Wasser auf ein Volumen von 25o ml aufgefüllt, um gleiche Messgeometrie und ähnliche Absorbtionsverhältnisse wie bei den Ganzkörpermessungen der Ratten zu simulieren. Aus diesem Messwertvergleich ergab sich für die im Ganzkörperzähler ermittelten Werte ein Umrechnungsfaktor von 1,65.

2.4 Verlauf der Zeit-Aktivität-Kurven in Abhängigkeit von der Vorbehandlung mit Jodid

Die Bestimmung des Aktivitäts-Zeit-Verlaufs nach ^{131}JDU Injektion war erforderlich, um aus Aktivitätsmessungen auf unterschiedliches mitogenes Geschehen im Gesamtorganismus schließen zu können. In Versuch C wurden je zwei mit PHA und ^{131}JDU und ausschließlich mit ^{131}JDU behandelte Tiere 24 Stunden lang in stündlichen Abständen, in den folgenden drei Tagen alle 12 Stunden gemessen. Die Impulsraten wurden als % Werte der Ausgangsaktivität halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 6). Etwa 32 Stunden nach ^{131}JDU Injektion fand sich ein linearer Abfall der Impulsraten. Zu diesem Zeitpunkt ist das aus der Dehalogenierung durch die Leber anfallende ^{131}J über

die Niere ausgeschieden. Dieses anfallende ^{131}J wird in die Jodspeicher, hauptsächlich in die Schilddrüse eingelagert und überdeckt bei Ganzkörpermessungen die Differenzen an eingelagertem ^{131}JDU in die DNA. Zum Absättigen dieser Jodspeicher wurde jeweils vor Versuchsbeginn als Trinkwasser eine 2 %ige Na-Jodid-Lösung gegeben. Unterschiede in der Jodspeicherung zeigt ein Vergleich der Normaltiere aus den Versuchsgruppen C und D (Abb. 8). Bei Erhöhung der NaJ-Konzentration im Trinkwasser auf 4 % wurde die LD_{50} für PHA erheblich gesenkt. Die in Versuch F_1 überlebenden Tiere zeigten wenige Tage nach Verabreichen des höher konzentrierten Trinkwassers ohne Ausnahme Symptome des "Jodismus" (Jodschnupfen).

3. Durchgeführte Untersuchungen

3.1 Versuche zur Dosierung von ^{131}JDU und zur Proliferationskinetik

Versuch A - D (n=17)

In den Versuchen A - D wurden Aktivitäts- Zeit - Kurven erstellt, die die Einlagerung von ^{131}J bzw. ^{131}JDU in den Gesamtorganismus in Abhängigkeit von PHA, sowie der Verabreichung von jodhaltigem Trinkwasser wiedergeben (abb. 6,7,8). Diese Versuche dienten der Dosierung des markierten DNA-Bausteins, der Jodausscheidung und Jodspeicherung.

Versuch E (n=4o)

In der Versuchsgruppe E wurde der markierte DNA-Baustein sofort im Anschluß an die PHA-Injektion und an weiteren 6 Tagen nach PHA in Zeitabständen von 24 Stunden angeboten. Vier Tage nach Markierung wurden die Tiere abgetötet und die Organe Lymphknoten, Thymus, Milz, Leber und Schilddrüse, sowie Blut entnommen und die Impulse pro Gramm Organgewebe, bzw. ml Blut bestimmt.

Versuch F_1 (n=4o)

Die Tiere erhielten unterschiedlich zu den übrigen Versuchen als Trinkwasser eine 4 %ige NaJodid-Lösung. Die meisten Tiere starben nach PHA-Injektion.

Versuch F (n=5o)

Bei diesem Versuchskollektiv wurden je 1o Tiere am 1., 2., 3. und 4. Tag nach PHA-Injektion, sowie eine

sche Aktivität bestimmt und als % Werte der Ganzkörperaktivität zum Zeitpunkt t = 0, t = 22 Stunden und t = 5 Tage dargestellt. Als Maß für den DNA-Verlust wird die Steigung der Kurven zwischen zwei Messpunkten verglichen. Der Abstand der Injektion von VINCRISTIN ^{R} und ENDOXAN ^{R} betrug 48 Stunden und entspricht dem in der Klinik üblichen Medikationsschema der Synchronisationstherapie mit VINCRISTIN ^{R} und ENDOXAN ^{R} (KLEIN, et al., 1972). Der Abstand zwischen PHA und ENDOXAN ^{R} betrug 24 Stunden.

Versuch I (n=4o)

Der Zeitplan dieses Versuchs entspricht dem des vorausgehenden mit der Abänderung, daß der markierte DNA-Baustein im Anschluß an die Medikation zytostatischer Substanzen und PHA gegeben wurde. Dadurch wird nicht der Verlust an DNA, sondern der Einfluß von ENDOXAN ^{R} auf die DNA-Synthese in Abhängigkeit von der vorausgehenden VINCRISTIN ^{R} - bzw. PHA-Injektion bestimmt. Gemessen wurden Ausgangs- und Endaktivität pro Gramm Ganzkörpergewicht und die organspezifische Aktivität von Lymphknoten, Thymus, Milz, Leber und Schilddrüse.

3.3 Statistische Auswertung

Bei der Auswertung von Versuch F wird angegeben:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} x_i \qquad = \text{Mittelwert}$$

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N} x_i (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$ = mittlerer Fehler der Einzelmessung

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{N}}$$ = mittlerer Fehler des Mittelwertes

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Ergebnisse der Versuche zur Proliferationskinetik des lymphatischen Systems nach PHA und zur Kombinationsmedikation von ENDOXAN ^{R}, VINCRISTIN ^{R} und PHA

4.1.1 Aus den Ganzkörpermessungen in Versuch C und D ergeben sich höhere Einbauraten von ^{131}JDU bei Tieren, die mit PHA behandelt wurden, als bei unbehandelten Tieren (Abb. 6, 7).

4.1.2 Der Einbau von ^{131}JDU ist sofort nach PHA-Injektion in allen Organen vermindert (Abb. 9 Tab. 1).

Tab. 1. Ipm/g Gewebe bei unbehandelten Tieren und Tieren mit ^{131}JDU-Markierung sofort nach PHA (n=4o)

	unbehandelt	nach PHA
Lymphknoten	741	249
Thymus	483	1o3
Milz	727	34o
Leber	189	61
Schilddrüse	632	48o
Blut	29	29

4.1.3 Im Blut aller Tiere ist keine Aktivitätsanreicherung nachweisbar (Tab. 2).

4.1.4 Der Einbau von ^{131}JDU ist 24 Stunden nach PHA-Injektion deutlich in Milz, Leber und Lymphknoten gesteigert (Tab. 3).

Tab. 2. Ipm/ml Blut, Markierung mit ^{131}JDU an 6 Tagen nach PHA (n=4o)

Tage nach PHA	unbehandelt	0	1	2	3	4	5	6
Ipm/ml Blut	29	29	31	3o	29	37	34	27

Tab. 3. Ipm/g Gewebe bei unbehandelten Tieren und Tieren mit ^{131}JDU-Markierung 24 Stunden nach PHA (n=1o)

	unbehandelt	24 Std. nach PHA
Lymphknoten	741	1488
Milz	727	162o
Leber	189	498

4.1.5 Die DNA-Synthese-Aktivität des Gesamtorganismus ist bis zum 2. Tag nach PHA erhöht und fällt am 3. und 4.Tag unter das Normalniveau (Abb. 11).

4.1.6 Der Aktivitätsverlust der einzelnen Versuchsgruppen untereinander zeigt etwa einen parallelen Verlauf und läßt eine Beeinflussung des Abbaues ^{131}JDU - markierter DNA, sowie der Ausscheidung des Halogens durch PHA-Medikation nicht erkennen (Abb. 1o).

4.1.7 Aus der Aktivitätsanreicherung in den Organen des unbehandelten Kollektivs ergibt sich folgende Verteilung der Mitoseaktivität in Normaltieren (Tab. 4)

Tab. 4. Organspezifische Unterschiede in der Mitoseaktivität bei Normaltieren (n=1o)

	Gesamtorganismus	Lymphknoten	Thymus	Milz	Leber
$\bar{x}$	1	2,o	4,4	2,4	o,3
$s_{\bar{x}}$		o,28	o,82	o,29	o,o3

4.1.8 Lymphknoten, Milz, Leber und Sternum zeigen einen Gipfel der DNA-Syntheseaktivität 24 Stunden nach PHA-Injektion dem ein steiler Abfall nach 48 Stunden folgt. Lymphknoten und Milz lassen einen zweiten geringen Anstieg erkennen. Der Thymus reagiert auf die PHA-Injektion mit einem sofortigen Absinken der DNA-Synthese, dem ein stetiger Anstieg vom 2. Tag an bis über das Normalniveau folgt (Abb. 11, 12 Tab. 5).

Tab. 5. Der Einfluß von PHA auf die DNA-Synthese nach der Zeit, dargestellt als Anreicherungsfaktor von ^{131}JDU (n=5o)

	unbehandelt	1. Tag n. PHA	2. Tag n. PHA	3. Tag n. PHA	4. Tag n. PHA	
Lymphknoten	2,o	5,o	2,2	3,8	3,5	$\bar{x}$
	o,28	1,14	o,45	o,47	o,92	$s_{\bar{x}}$
Thymus	4,4	2,5	1,1	3,6	5,9	$\bar{x}$
	o,82	o,62	o,38	o,33	o,72	$s_{\bar{x}}$
Milz	2,4	8,1	2,1	4,1	3,o	$\bar{x}$
	o,29	1,44	o,94	o,33	o,33	$s_{\bar{x}}$

Fortsetzung Tab. 5.

	unbehandelt	1. Tag n. PHA	2. Tag n. PHA	3. Tag n. PHA	4. Tag n. PHA	
Leber	o,3	1,1	o,6	o,4	o,4	$\bar{x}$
	o,o3	o,23	o,17	o,o6	o,o5	$s_{\bar{x}}$
Sternum	o,6	o,9	o,4	o,5	o,6	$\bar{x}$
	o,14	o,17	o,o8	o,o5	o,o6	$s_{\bar{x}}$

4.1.9 Ein relativer Vergleich der untersuchten Organe bezüglich ihrer DNA-Synthese zeigt einen deutlichen Unterschied im Sinne einer hohen DNA-Synthese in Lymphknoten, Milz und Thymus gegenüber der Leber (Abb. 11, 12).

4.1.1o Eine Darstellung des Vielfachen der normalen DNA-Synthese hingegen zeigt eine Steigerung in der Leber bis etwa auf das Vierfache (Abb. 13).

4.1.11 In der Skelettmuskulatur aller Tiere ist keine Aktivitätsanreicherung von ^{131}JDU nachweisbar.

4.1.12 Der DNA-Verlust im Zeitraum t = 22 bis t = 44 Stunden (Versuch H), nach VINCRISTIN ^{R} und vor ENDOXAN ^{R}-Injektion ist abhängig von VINCRISTIN ^{R} 2,3 mal so groß wie bei der Kontrollgruppe (t = Zeit in Stunden nach Injektion von ^{131}JDU). Ein zweiter Gipfel des DNA-Verlustes zeigt das gleiche Kollektiv nach ENDOXAN ^{R} im Zeitraum t = 69 bis t = 93 Stunden. Das Verhältnis zum Normaltier ist 6 : 1.
Die alleinige Injektion von ENDOXAN ^{R} führt im sofortigen Anschluß daran zu einer Steigerung des DNA-Verlustes, der doppelt so hoch ist wie beim Nor-

maltier. Dieser Gipfel fehlt, wenn 24 Stunden zuvor PHA injiziert wird (Abb. 14, 15).

4.1.13 Die Darstellung der organspezifischen Aktivität als % Werte von Anfangs- und Endaktivität, sowie der Aktivität zum Zeitpunkt t = 22 läßt einen deutlichen Einfluß der Kombinationsmedikation von VINCRISTIN ^{R} und ENDOXAN ^{R} auf den DNA-Verlust erkennen (Abb. 16, Tab. 6).

Tab. 6. Unterschiedlicher Aktivitätsverlust zwischen Tieren mit VINCRISTIN ^{R} und ENDOXAN ^{R} und ausschließlicher ENDOXAN ^{R} - Medikation, dargestellt als % Werte der Aktivität zum Zeitpunkt t_0 + 22 Stunden (n=2o)

ORGAN	VINCRISTIN ^{R} + ENDOXAN ^{R}	ENDOXAN ^{R}
Ganztier	13	21
Lymphknoten	27	61
Thymus	19	89
Milz	11	56
Leber	4	6
Schilddrüse	1o	24

4.1.14 Die Kombination PHA - ENDOXAN ^{R} vermindert deutlich die Aktivitätsverluste gegenüber der ausschließlichen ENDOXAN ^{R} - Medikation (Abb. 16, Tab. 7).

Tab. 7. Unterschiedlicher Aktivitätsverlust zwischen Tieren mit PHA und ENDOXAN ^{R} und ausschließlicher ENDOXAN ^{R} - Medikation, dargestellt als % Werte der Aktivität zum Zeitpunkt t_0 + 22 Stunden (n=2o)

ORGAN	PHA + ENDOXAN ^{R}	ENDOXAN ^{R}
Ganztier	23	21
Lymphknoten	78	61
Thymus	1o7	89
Milz	58	56
Leber	11	6
Schilddrüse	3o	24

4.1.15 Lymphknoten, Thymus und Milz zeigen 48 Stunden nach ENDOXAN ^{R} - Injektion eine Verminderung des Einbaues von ^{131}JDU in die DNA um mehr als 2/3. In der Leber hingegen fehlt diese Wirkung vollständig.

4.1.16 Die Kombination von VINCRISTIN ^{R} und ENDOXAN ^{R} im Abstand von 48 Stunden verringert nicht den Einbau von ^{131}JDU in die DNA, sondern steigert ihn gegenüber der ausschließlichen ENDOXAN ^{R} - Injektion (Tab. 8).

Tab. 8. Unterschiedlicher Einbau von ^{131}JDU in die DNA von Tieren mit VINCRISTIN ^{R} und ENDOXAN ^{R}

und ausschließlicher ENDOXAN ^{R} - Medikation, dargestellt als % Werte der Endaktivität (n=2o)

ORGAN	VINCRISTIN ^{R} + ENDOXAN ^{R}	ENDOXAN ^{R}
Lymphknoten	57	34
Thymus	42	29
Milz	71	41
Leber	3o	15
Schilddrüse	88	22

4.1.17 Der Einfluß einer PHA-Injektion 24 Stunden vor ENDOXAN^{R} auf die DNA-Synthese ist gleichsinnig einer vorausgehenden VINCRISTIN ^{R} - Injektion, wenn auch geringer ausgeprägt. Die Differenzen in der Darstellung der organspezifischen Aktivität als % Werte von Ausgangs- und Endaktivität bezüglich des Einflusses von PHA auf die ENDOXAN ^{R} - Wirkung müssen als einen Effekt des PHA im Sinne einer Beeinflußung der Dehalogenierung von ^{131}JDU durch die Leber angesehen werden (Tab. 9).

Tab. 9. Unterschiedlicher Einbau von ^{131}JDU in die DNA von Tieren mit PHA und ENDOXAN ^{R} und ausschließlicher ENDOXAN ^{R} - Injektion, dargestellt als % Werte der Endaktivität (n=2o)

ORGAN	PHA + ENDOXAN R	ENDOXAN R
Lymphknoten	4o	34
Thymus	35	29
Milz	57	41
Leber	34	15
Schilddrüse	34	22

4.2 Diskussion der Versuchsdurchführung und der Ergebnisse

4.2.1 Diskussion der Versuchsdurchführung

Zur Beurteilung der mitogenen Wirkung von PHA, wie zur Klärung des unterschiedlichen zytotoxischen Effekts verschiedener zytostatischer Kombinationstherapien war es notwendig, Zellbestandteile zu markieren, deren Zunahme bzw. Verlust gleichzusetzen ist mit Mitose und Endomitose bzw. Zelluntergang. Diese Voraussetzung ist mit der Markierung der DNA durch radioaktives Thymidin, einem nur dort verwandten Baustein erfüllt. Aus messtechnischen Gründen wurde das dem Thymidin analoge ^{131}JDU benutzt. Die Markierung der DNA mit einem Gamma-Strahler erlaubt eine Aktivitätsmessung von außen und ergibt somit Messreihen am lebenden Tier. Der Markierungszeitraum des Mitosegeschehen im Organismus nach ^{131}JDU - Injektion ist in Folge der biologischen Halbwertszeit von ^{131}JDU auf eine kleine Zeitspanne beschränkt. Nimmt man den oberen Wert der angegebenen biologischen Halbwertszeit von 3 Minuten an (ERTL, 197o), so stehen nach 3o Minuten nur noch etwa o,1 % der anfänglichen Substanz für die Markierung zur Verfügung. Daraus folgt die Interpretation der Meßwerte im Sinne einer Punktmarkierung. Eine lineare Abhängigkeit von Aktivität und Impulsraten ist abhängig vom Messgerät nur im Bereich größer O und kleiner 25 μCi gegeben (Abb. 3).

Inwieweit die Konzentration von ^{131}JDU, letztlich das angebotene Verhältnis von Thymidin und ^{131}JDU den Einbau des markierten Bausteins in die DNA beeinflußt, wurde nicht systematisch untersucht, da die verabreichte Aktivitätsmenge pro Tier innerhalb eines Versuchs in etwa konstant blieb. Wie weiterhin aus eigenen Analysen ersichtlich war, entsprachen in den einzelnen Chargen die angegebenen Daten über die spezifische Aktivität der Substanz nicht den tatsächlichen Werten. Die eigenen Analysen erfolgten mittels Dünnschichtchromatographie (PEI-Cellulose-Platten, Fließmittel: o,1 molare Ammoniumhydrogencarbonatlösung). Aus einem Teil der Verbindung war das markierte Jod herausdissoziiert und somit wäre ein Vergleich verschiedener Versuchsgruppen nur bei der Kenntnis der jeweiligen spezifischen Aktivität möglich gewesen.
Unterschiedliche Abbaugeschwindigkeiten von ^{131}JDU, bedingt durch unterschiedliche Stoffwechselleistungen der Leber und somit stark differierende biologische Halbwertszeiten ließen sich in den Versuchen A - F und I dadurch ausschließen, als die Darstellung der organspezifischen Aktivität als % Werte der Anfangs- wie der Endaktivität pro Gramm Ganzkörpergewicht etwa gleiche Kurvenbilder zeigen. Andere Verhältnisse liegen bei Versuch H vor. Auffällig ist hier der verminderte Aktivitätsverlust zum Zeitpunkt

t = 22 Stunden derjenigen Versuchsgruppe, der sofort im Anschluß an die Markierung mit ^{131}JDU VINCRISTIN ^{R} injiziert wurde. Theoretisch bieten sich zwei Möglichkeiten der Interpretation an:

a) Als Folge der VINCRISTIN ^{R} - Injektion wird im Markierungszeitraum vermehrt DNA synthetisiert,

b) der Abbau von ^{131}JDU wird beeinflußt und somit die biologische Halbwertszeit von ^{131}JDU verändert.

Gegen den ersten Grund spricht die Tatsache, daß von VINCRISTIN ^{R} keine mitogenen Eigenschaften bekannt sind. Die Frage, wie weit VINCRISTIN ^{R} die Funktion der Leber bei der Dehalogenierung von ^{131}JDU beeinflußt und somit den Markierungszeitraum durch eine größere biologische Halbwertszeit von ^{131}JDU verlängert, ist experimentell nicht abgeklärt. Um diese Überlegungen aus der Interpretation der Versuchsergebnisse auszuschließen, werden in Versuch H die organspezifischen Aktivitäten als % Werte der Ganzkörperaktivität zum Zeitpunkt t = 22 Stunden dargestellt.

In Aktivitätsbereichen größer 0 und kleiner 25 Ci und unter der Voraussetzung annähernd gleicher Anfangsaktivitäten ist somit der Vergleich von Impulszahlen als ein direktes Maß für Mitose bzw. Endomitosegeschehen und Zelluntergang zulässig.

4.2.2 Diskussion der Ergebnisse

Proliferationskinetik:

Aus eigenen morphologischen Arbeiten (PAPPAS et al., 1972) ist bekannt, daß Ratten auf eine einmalige PHA-Injektion hin (7,18 und 6,25 mg/kg Körpergewicht) eine beschleunigte Zunahme des Körpergewichts zeigen und eine erhebliche Milzvergrößerung aufweisen. GAMBLE, 1966, hat diesen Einfluß des Phytohaemagglutinins auf die Milz von Mäusen näher untersucht und eine Verdopplung des Milzgewichtes am dritten Tag nach PHA gefunden, der ein weiterer kleiner Gipfel der Gewichtszunahme zwischen dem 5. und 6. Tag folgt. Parallel zu dieser Gewichtszunahme beschreibt der Autor ebenfalls eine Verdopplung der Milzzellen am 5. Tag und einen Anstieg der Mitoserate auf etwa das 11-fache am 3. Tag nach PHA-Injektion. Vergleichen wir die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Kurvenbildern von GAMBLE, so sind sie diesen ähnlich, jedoch mit einer Zeitverschiebung von 2 Tagen (Abb. 18). Diese Zeitverschiebung von 2 Tagen erklärt sich aus der unterschiedlichen Methodik. Durch die Markierung der DNA mit ^{131}JDU wird die DNA-Verdopplung zeitlich erfaßt, während es sich bei GAMBLE um eine Darstellung des mitogenen Effekts von PHA nach morphologischen Gesichtspunkten handelt. Quantitative Vergleiche sind nicht möglich, da weder PHA-Dosis noch Tiermaterial den hier durchgeführten Versuchen entsprechen. Ebenfalls von der Morphologie her wird ein

weiteres Ergebnis dieser Arbeit durch BISHUN, 1965 bestätigt. Er bestimmte den Mitoseindex des Knochenmarks von unterschiedlich alten Ratten 22 Stunden nach PHA-Injektion. Die Steigerung der Mitoserate liegt abhängig vom Alter der Ratten zwischen dem o,4 - und 4,6 -fachen der Kontrolltiere.
LOZZIO, 1969, weist in einer Gegenüberstellung von PHA-M und PHA-P ebenfalls auf die mitogenen Eigenschaften des Phytohaemagglutinins in vivo hin.
MACHADO, et al., 1968, berichten, daß es bei Mäusen 24 Stunden nach i.p.-Injektion von 3o mg PHA-P Difco/1oo g Körpergewicht zu deutlichen Strukturveränderungen in Milz, Lymphknoten, Thymus und Leber kommt. Zu diesem Zeitpunkt finden sie bei histologischen Untersuchungen von Thymusrinde, Milzfollikeln und den Keimzentren der Lymphknoten zahlreiche Lymphozyten in der Mitose. In dieser Arbeit wird erstmalig der Einfluß von PHA auf das Leberparenchym und die Kupfer'schen Sternzellen erwähnt. Ein Tag nach PHA werden Leberparenchymzellen mit zwei Kernen beobachtet; ebenso hypertrophe und mitotische Kupfer'sche Sternzellen. Diese Veränderungen der Leber klingen im weiteren Verlauf des Experiments ab. Abweichend von diesen Befunden läßt sich durch die vorliegenden Versuche unter dem Einfluß von PHA keine Proliferationssteigerung im Thymus nachweisen. Es findet sich 24 Stunden nach PHA etwa die Hälfte und 48 Stunden nach PHA nur

ein viertel der normalen DNA-Synthese. Erst am 4. Tag nach PHA zeigt sich eine Steigerung der DNA-Synthese auf das 1,35 -fache (Abb. 13.).
Ob die beschriebene Gewichtsabnahme des Thymus durch das Auswandern von Thymozyten ein spezifischer Effekt des PHA ist, muß bezweifelt werden, da man ähnliche Befunde nach Injektion von gänzlich anders gearteten Substanzen wie Cystein und Isocystein ebenfalls findet (BRAUN, ALBACH, 1970). Übereinstimmend wird beiallen zitierten Autoren der mitogene Einfluß von PHA auf das lymphatische Gewebe beschrieben. Wie weit die unterschiedliche Methodik, die injizierte Menge PHA oder die Tierart Unterschiede in der Quantität des Effekts und der zeitlichen Zuordnung von Injektion und Beginn der Veränderungen bedingen, ist nur sehr schwer nachzuprüfen. Die vorliegende Arbeit versucht erstmals den mitogenen Einfluß von PHA auf die Gesamtheit des lymphatischen Systems in Form einer zeitlichen Zuordnung von DNA-Synthese und PHA-Injektion darzustellen. Die injizierte PHA-Dosis orientiert sich dabei an einer festen Bezugsgröße, der LD_{50}, die für den verwendeten Tierstamm mit 8,8 mg/kg Körpergewicht angegeben wird (PAPPAS, et al., 1972). Die Darstellung der unterschiedlichen DNA-Synthese durch Markierung der DNA mit ^{131}JDU bedeutet gegenüber der Auszählung histologischer Präparate sicher eine Vereinfachung und verkleinert den methodischen Fehler.

Es wird somit durch eine Methode größerer Objektivität der Einfluß einer mitogenen Substanz auf die Gesamtheit des lymphatischen Systems dargestellt und gegen andere, nicht lymphatische Gewebe abgegrenzt.

PHA und ENDOXAN ^{R} im Vergleich zur Synchronisationstherapie mit VINCRISTIN ^{R} und ENDOXAN ^{R}:
Ausgehend von den oben genannten Befunden, die eine Steigerung der DNA-Synthese 24 Stunden nach PHA zeigen, ergibt sich die Frage, wie weit eine solche Synchronisation der DNA-Synthese die Wirksamkeit von Proliferationsgiften verbessern könnte. Zwar zeigte die PHA-Injektion einen sofortigen DNA-Synthese-Stop, der auch in der Schilddrüse nachweisbar ist (Abb. 9), jedoch beschränkt sich die daran anschließende Steigerung der DNA-Synthese 24 Stunden nach PHA auf das lymphatische Gewebe. Der Einfluß auf die Leber ist absolut gesehen gering (Abb. 11, 12). Daraus ergibt sich theoretisch eine Möglichkeit der spezifischen Einflußnahme auf die Proliferation der lymphatischen Organe durch eine Kombination von PHA und ENDOXAN ^{R}. Ähnliche Überlegungen liegen der Anwendung einer Kombination von VINCRISTIN ^{R} und ENDOXAN ^{R} zu Grunde (KLEIN und LENNARTZ, 1972). Hier werden die Mitosen durch VINCRISTIN ^{R} vorübergehend in der Metaphase arretiert, um in der Folge teilsynchron in die DNA-Synthese-Phase zu gelangen.

Wir müßten somit als Ergebnis einer VINCRISTIN R-Medikation 48 Stunden und als Folge von PHA 24 Stunden später eine gesteigerte Wirksamkeit von ENDOXAN R erwarten können und zwar bei der Kombination von PHA und ENDOXAN R eine Steigerung der Wirksamkeit, die sich auf das lymphatische System beschränkt. Als Kriterien für die Wirksamkeit von ENDOXAN R bieten sich einmal die unterschiedlichen Verluste von markierter DNA an, zum anderen Unterschiede in der DNA-Verdopplung nach ENDOXAN R. Für die Kombination von VINCRISTIN R und ENDOXAN R bestätigen sich in unseren Versuchen die oben angeführten Überlegungen. Die Injektion von PHA vor ENDOXAN R hingegen hebt den zytotoxischen Effekt von ENDOXAN R auf, und dies nicht speziell im lymphatischen Gewebe, sondern auch in der Schilddrüse (Abb. 16). In der Beeinflußung der DNA-Synthese 48 Stunden nach ENDOXAN R zeigt die vorausgehende Injektion von VINCRISTIN R oder PHA keine sehr ausgeprägte Wirkung in Lymphknoten, Thymus und Milz. In der Leber hingegen führt die Kombination von VINCRISTIN R wie auch von PHA mit ENDOXAN R zu einer Steigerung der DNA-Synthese auf mehr als das Doppelte der Normalwerte. In der Schilddrüse findet sich diese DNA-Synthese-Steigerung nur nach VINCRISTIN R und ENDOXAN R (Abb. 17).

Entgegen unseren theoretischen Überlegungen führt die gesteigerte DNA-Synthese im lymphatischen System

nicht zu einer Verstärkung des zytotoxischen Effekts von ENDOXAN R. Damit bestätigen sich die in vitro Versuche von STEFANI und SCHREK, 1964 sowie von PAPPAS, et al., 1972, die dem PHA einen Schutzeffekt gegenüber der Wirkung von Lost auf Lymphozyten zusprechen. Wie weit dieser "Schutzeffekt" des PHA den unerwünschten Einfluß zytostatischer Substanzen auf das lymphopoetische System abmildern kann und somit seinen therapeutischen Einsatz rechtfertigt (ISRAEL, et al., 1965; BROCARD, et al., 1967; 1968; EGGERT, et al., 1969) kann hier nicht beantwortet werden.

5. Zusammenfassung

1. Die Markierung der DNA mit ^{131}JDU erlaubt eine Aussage über die Steigerung der DNA-Synthese zu einem bestimmten Zeitpunkt nach PHA (Punktmarkierung) und gestattet Messungen des DNA-Verlustes nach zytotoxischen Substanzen am lebenden Tier.
2. Die Injektion von 5 mg PHA/kg Körpergewicht führt zu einem sofortigen Stop der DNA-Synthese in allen lymphatischen Organen und in der Schilddrüse, dem eine gesteigerte Synthese ausschließlich im lymphatischen System folgt.
3. Der erste Gipfel der gesteigerten DNA-Synthese findet sich 24 Stunden, ein zweiter 3 Tage nach PHA-Injektion.
4. Im Thymus führt PHA zu einer Depression der DNA-Synthese.
5. Ein Vergleich der Kombination von VINCRISTIN ^{R} und PHA mit ENDOXAN ^{R} zeigt, daß die theoretischen Überlegungen hinsichtlich eines gesteigerten zytotoxischen Effekts von ENDOXAN ^{R} durch vorausgehende synchrone Steigerung der DNA-Synthese des lymphatischen Systems mit PHA sich nicht bestätigen.
6. PHA zeigt in allen untersuchten Organen einen Schutzeffekt gegenüber der ENDOXAN ^{R} - Wirkung.

6. Abbildungen

18 Abbildungen;
auf die einzelnen Abbildungen wird im Text verwiesen.

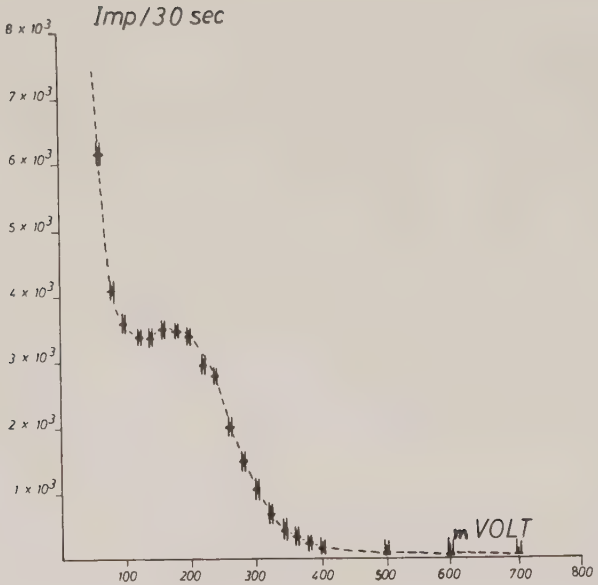


Abb. 1: Impulshöhenspektrum von ^{131}J;
Impulsdichte in Abhängigkeit von der Impulshöhe

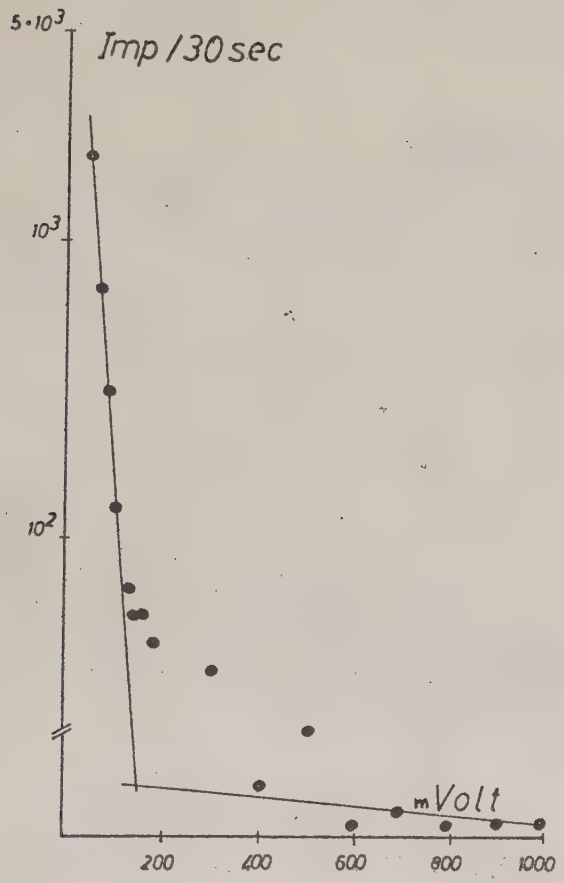


Abb. 2: Nulleffektskurve

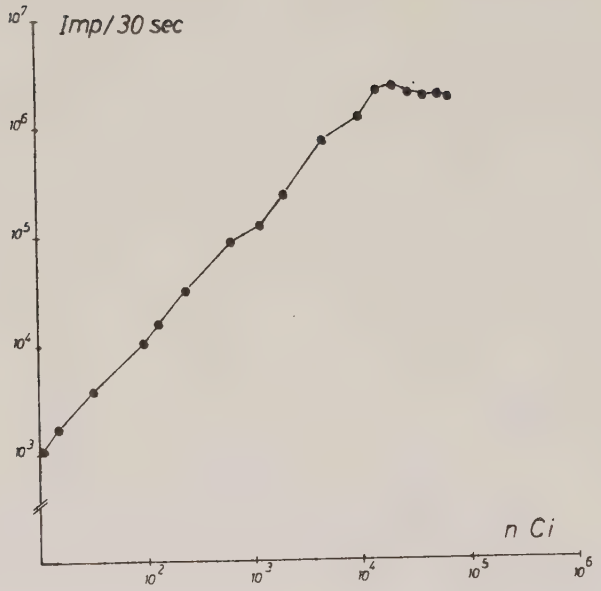


Abb. 3: Impulsraten - Aktivitätskurve für ^{131}J; integrale Messung bei Einstellung des Diskriminators unterhalb des Bereichs des Comptoneffektes von ^{131}J

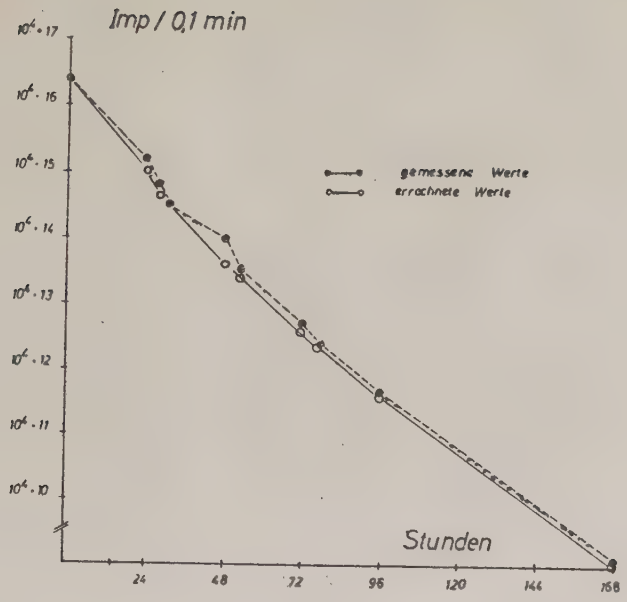


Abb. 4: Vergleich von gemessenem und errechnetem Aktivitätsverlust eines ^{131}J - Standard

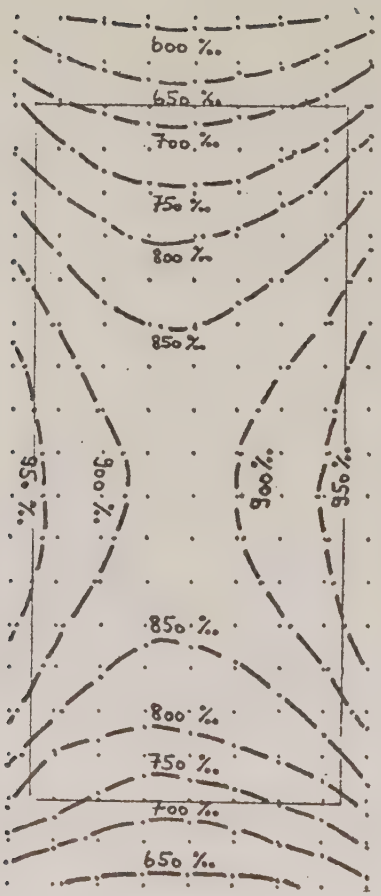


Abb. 5: Linien gleicher Messgenauigkeit des Ganzkörperzählers

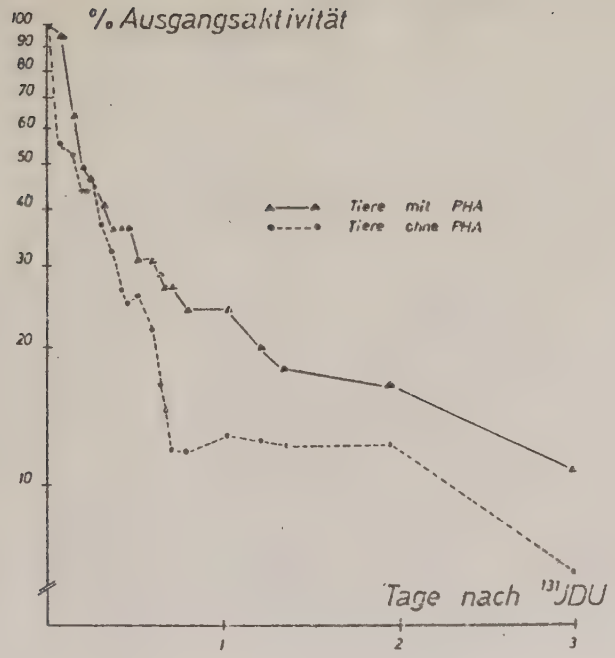


Abb. 6: Zeit - Aktivitäts - Kurven aus Ganzkörpermessungen ohne Absättigung der Jodspeicher; halblogarithmische Darstellung

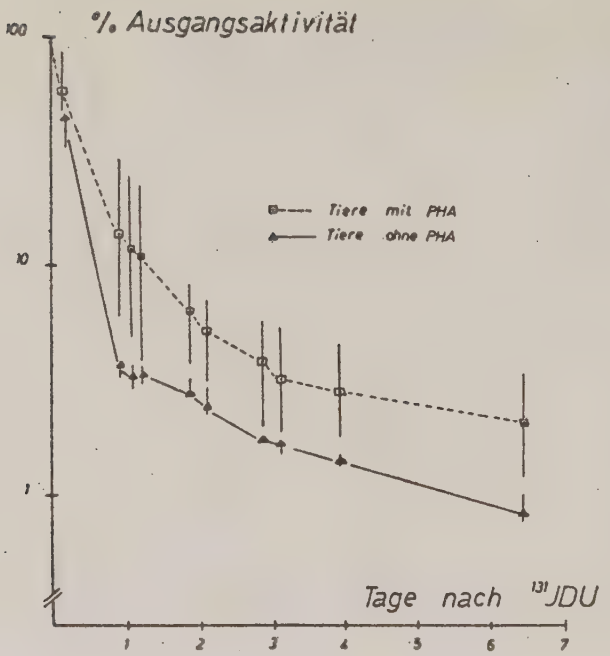


Abb. 7: Zeit - Aktivitätskurven aus Ganzkörpermessungen nach Absättigung der Jodspeicher; halblogarithmische Darstellung
Länge der Symbole = höchster und tiefster Wert

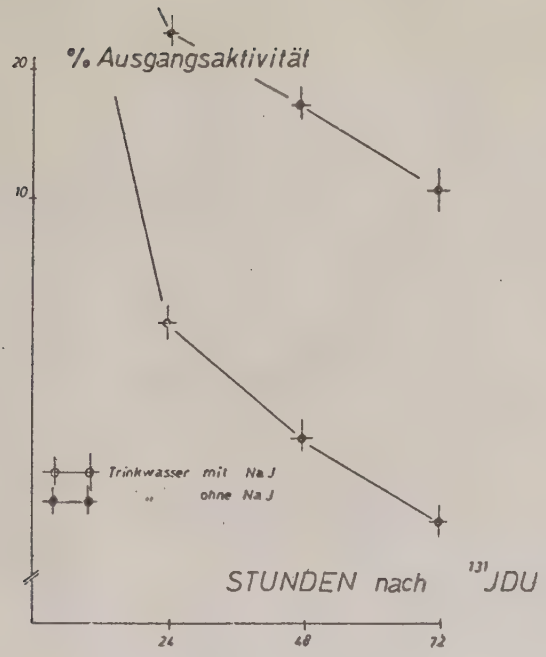


Abb. 8: Ausscheidung von ^{131}J mit und ohne vorausgehende Verabreichung von Jod im Trinkwasser (2%ig)

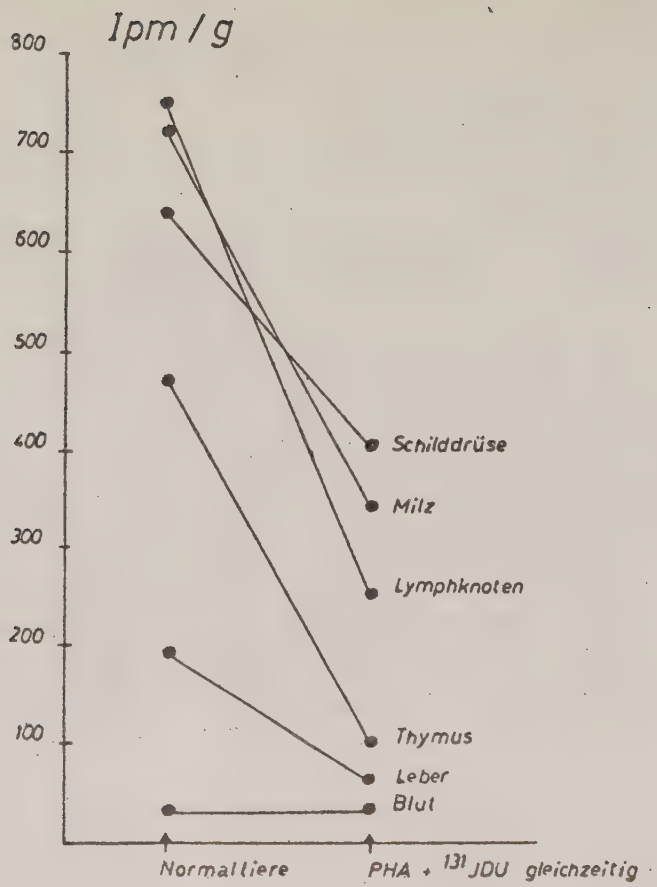


Abb. 9: Einlagerung von ^{131}JDU bei Normaltieren und sofort nach PHA; Impulszahlen auf gleiche Ausgangsaktivität/g Ganzkörper umgerechnet

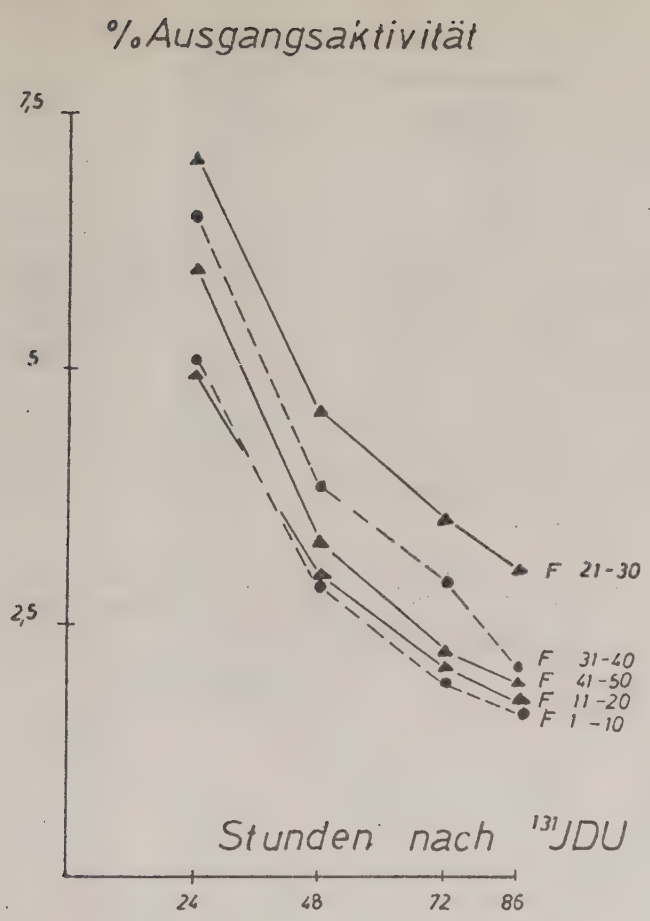


Abb. 1o: Zeit - Aktivitäts - Kurven aus Ganzkörpermessungen nach vorausgegangener Injektion von PHA, ein, zwei, drei und vier Tage vor ^{131}JDU

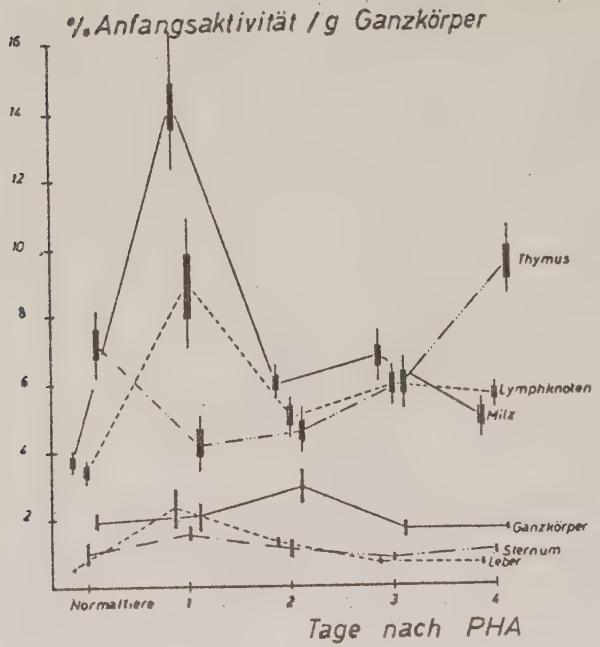


Abb. 11: Einbau von ^{131}JDU in Lymphknoten, Thymus, Milz, Leber und Sternum am 1., 2., 3. und 4. Tag nach PHA, dargestellt als %-Werte der Ausgangsaktivität / g Ganzkörper; Länge der Symbole = mittlere Abweichung vom Mittelwert ($s_{\bar{x}}$)

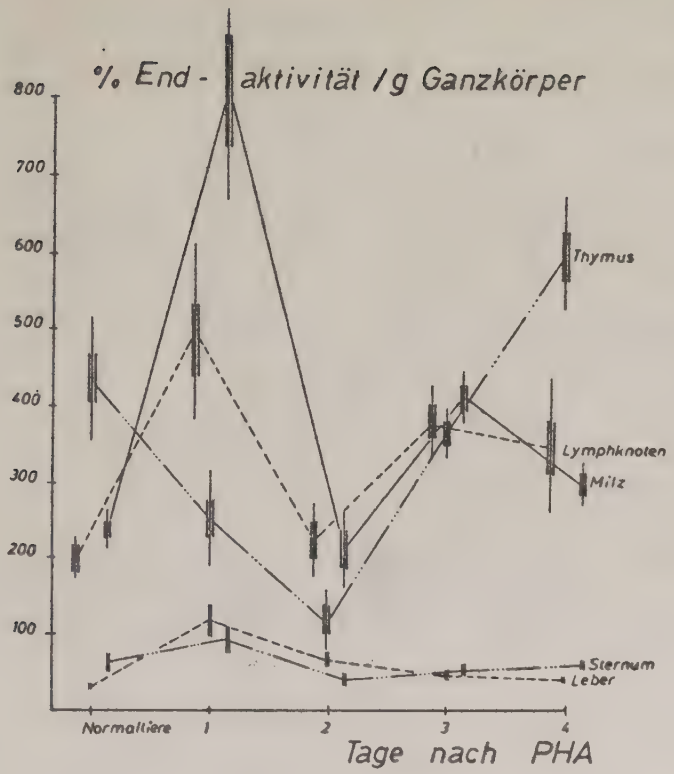


Abb.12: Einbau von ^{131}JDU in Lymphknoten, Thymus, Milz, Leber und Sternum am 1., 2., 3. und 4. Tag nach PHA, dargestellt als %-Werte der Endaktivität / g Ganzkörper;
Länge der Symbole = mittlere Abweichung vom Mittelwert ($s_{\bar{x}}$)

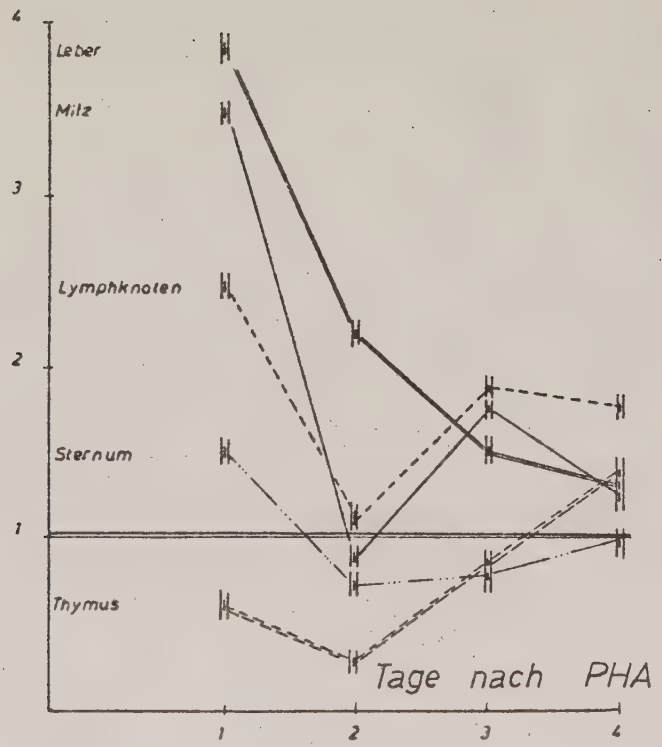


Abb. 13: Vielfaches der normalen Einlagerung von ^{131}JDU in die DNA von Lymphknoten, Thymus, Milz, Leber und Sternum, 24 Stunden nach PHA

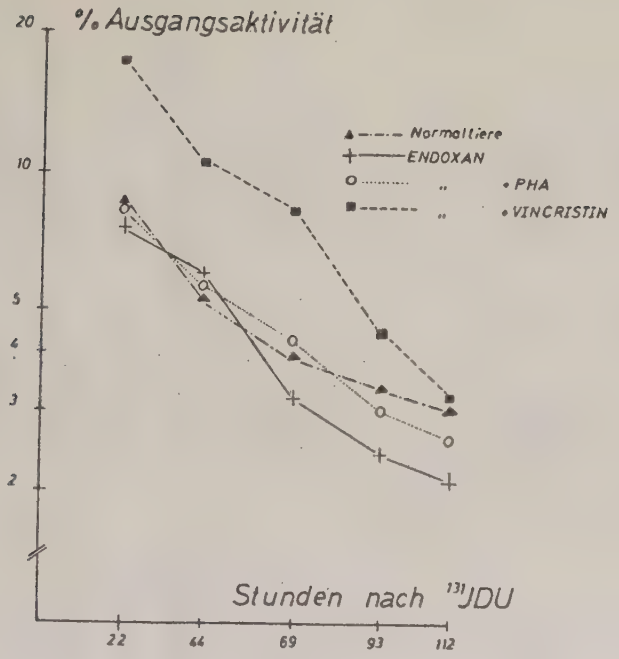


Abb. 14: Zeit - Aktivitäts - Kurven bei Injektion von ENDOXAN^{R} und dessen Kombination mit VINCRISTIN^{R} oder PHA

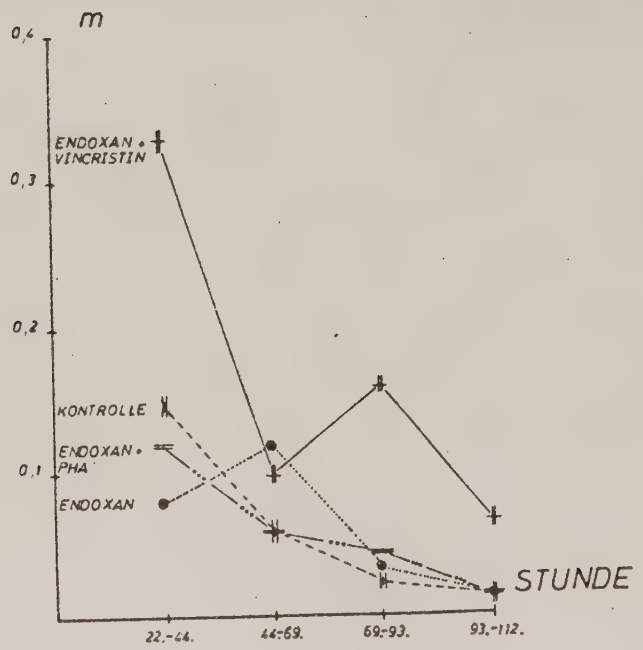


Abb. 15: negative Steigung der Zeit-Aktivitäts-Kurven in Abb. 14 als Maß für den DNA-Verlust zwischen den Meßpunkten

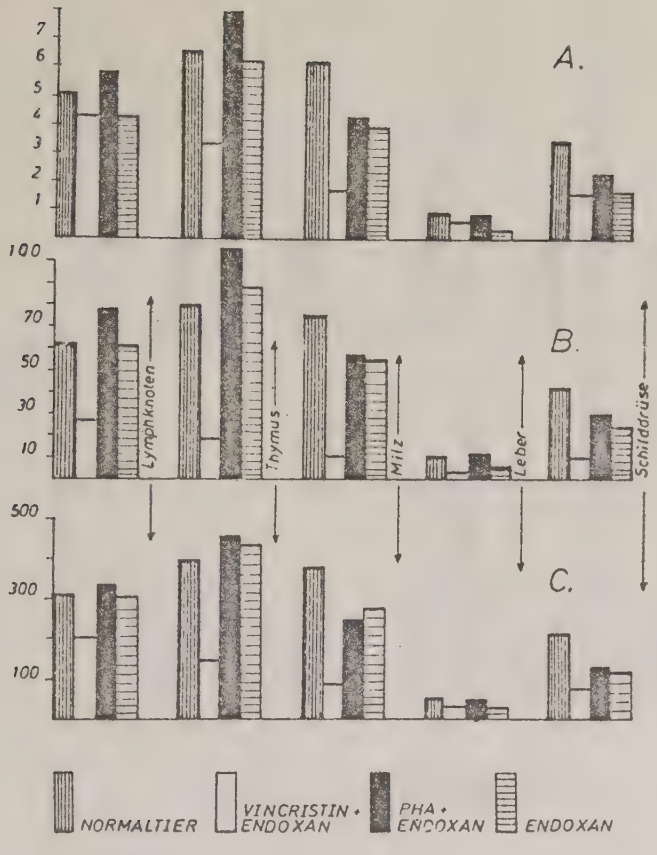


Abb. 16: organspezifische Aktivität von Lymphknoten, Thymus, Milz, Leber und Schilddrüse nach ENDOXAN^{R}- Injektion und dessen Kombination mit VINCRISTIN^{R} oder PHA, dargestellt als:
A.: %-Werte der Ausgangsaktivität/g Ganzkörper
B.: %-Werte der Aktivität bei t=22/g Ganzkörper
C.: %-Werte der Endaktivität/g Ganzkörper

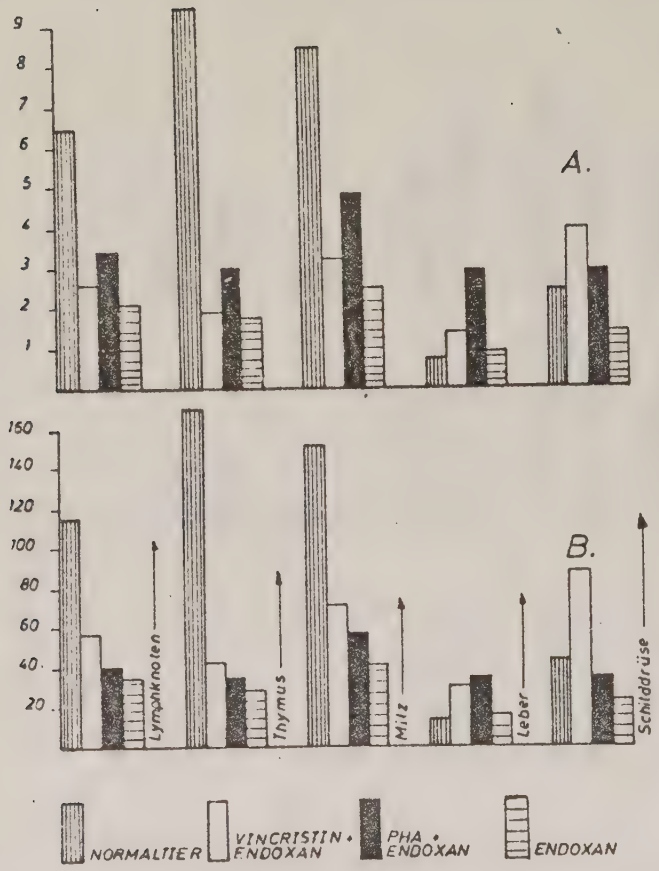


Abb. 17: organspezifische Aktivität von Lymphknoten, Thymus, Milz, Leber und Schilddrüse nach ENDOXAN^{R}- Injektion und dessen Kombination mit VINCRISTIN^{R} oder PHA und anschließender Markierung der DNA mit ^{131}JDU,

A.: %-Werte der Ausgangsaktivität/g Ganzkörper

B.: %-Werte der Endaktivität/g Ganzkörper

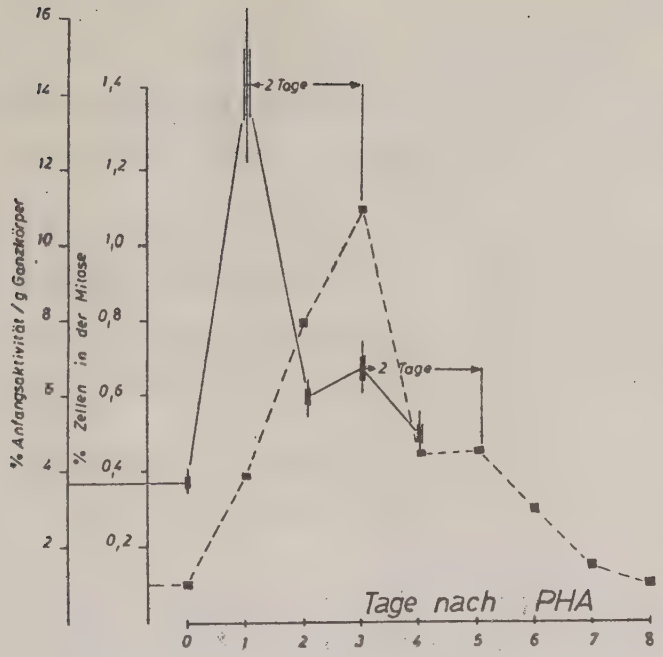


Abb. 18: Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit den Befunden von GAMBLE, 1966, zur Proliferationskinetik nach PHA

7. Literaturverzeichnis

1. BEER, C. T.: Lloydia 27, 352 (1964); zitiert nach FUSENIG, N. F., OBRECHT, P.: Der Wirkungsmechanismus der Vinca-Alkaloide. In: GMACHEL, E. (ed.): Internationales Symposion über die Anwendung der Vinca-Alkaloide Velbe und Vincristin (Urban & Schwarzenberg: München 1969), 141

2. BISHUN, N. P., MORTON, W. R. M., McLEVERTY, B.: The effekt of Phytohemagglutinin in vivo on the mitotic activity of the bone marrow cells in young rats. Experientia (Basel) 21, 527 (1965).

3. BRAUN, H., ALBACH, W.-D.: Untersuchungen zur Wirkung resistenzsteigernder SH-Verbindungen am bestrahlten Thymus. Strahlentherapie 14o/4, 433 (197o).

4. BROCARD, H., AKOUN, G.: L'action de la phytohémagglutinin dans la prévention et le traitement des accidents hématologiques de la chimiothérapie des cancers broncho-pleuro-pulmonaires. Press méd. 75, 413 (1967).

5. BROCARD, H., AKOUN, G.: L'action de la phytohémagglutinin dans la prévention et le traitement des accidents hématologiques de la chimiothérapie des cancers broncho-pleuro-pulmonaires. Soc. Med. Hôp. Paris 118, 157 (1967).

6. BROCARD, H., AKOUN, G.: Les résultats de la polychimiothérapie de attaque des cancers broncho-pleuro-pulmonaires. La phytohémagglutinin dans la prévention et le traitement des accidents hématologiques des antimitotiques. Poumon 24, 33 (1968).

7. BROCARD, H., AKOUN, G., TURPIN, G., GENDRE, J. P.: Le traitement de attaque des cancers broncho-pleuro-pulmonaires par la polychimiothérapie sous protection de phytohémagglutinine. Press méd. 75, 413 (1967).

8. BROCARD, H., AKOUN, G., TURPIN, G., GENDRE, J. P.: Le traitement de attaque des cancers broncho-pleuro-pulmonaires par la polychimiothérapie sous protection de phytohémagglutinine. Soc. Méd. Hôp. Paris 118, 139 (1967).

9. BROCK, N.: Pharmakologische Grundlagen der Chemotherapie maligner Tumoren. Oncologia 14, 224 (1961).

10. BROCK, N., SCHNEIDER, B.: Zur Frage der carcinogenen Wirkung von Krebs-Chemotherapeutica und Immunsuppressiva. Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 21, 435 (1971).

11. DRUCKREY, H., STEINHOFF, D., NAKAYAMA, M., PREUSSMANN, R., ANGER, K.; Experimentelle Beiträge zum Dosis-Problem in der Krebs-Chemotherapie und zur Wirkung von Endoxan. Dtsch. med. Wschr. 13, 651 (1963).

12. DUKOR, P., DIETRISCH, F. M.: Impairment of phytohaem-agglutinin-induced blastic transformation in lymphnodes from thymectomized mice. Int. Arch. Allergy 32, 521 (19 67).

13. EGGERT, G., KÜHBÖCK, J., POKORNY, D.: Zur Verabreichung von Phyto-haemagglutinin bei zytosta-tischer Therapie. Wien Z. inn. Med. 5o, 587 (1969).

14. ERTL, H. H.: Dosimetrie und biologische Wirkung des Anger-Effekts. Ganzkörpermessung mit intra-nuclearem 124-Jod-Deoxy-Uridin. Inauguraldissertation, Düsseldorf (197o).

15. FEINDEGEN, L. E., BOND, V., HUGHES, W. L.: 125-J-DU in autoradiographic studies of cell proliferation. Exp. Cell. Res. 43, 1o7 (1966).

16. FUNDENBERG, H. H., GOOD, R. A., HITZIG, W.: Classification of the primary immune deficiencies: WHO recommendation. N. Engl. J. med. 283, 656 (197o).

17. FUSENIG, N. E., OBRECHT, P.: Der Wirkungsmechanismus der Vinca-Alkaloide. In: GMACHEL, E. (ed.): Internationales Symposion über die Anwendung der Vinca-Alkaloide Velbe und Vincristin. (Urban & Schwarzenberg: München 1969), 141.

18. GAMBLE, C. N.: The effekts of phytohaem-agglutinin on mouse spleen cells in vivo. Blood 28, 175 (1966).

19. GERHARDS, H. J., GRAUL, E. H.: Autoradiographische Untersuchungen über die Verteilung von ^{3}H-Cyclophosphamid in der Ratte. Drug Res. 2o,6o1 (197o).

2o. GREAVES, N. F., ROITT, T. M., ROSE, N. E.: Effekt of bursectomy and thymectomy on the responses of chicken, peripheral blood lymphocytes to phytohaem-agglutinin. Nature 22o, 293 (1968).

21. HABERS, E.: Nucleinsäuren, Biochemie und Funktion. Einführung in die Molekular-biologie Bd. 1 Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1969).

22. HUGHES, W. L., COMMERFORD, S. L., GITHLIN, D., KRUEGER, R. C., SCHULTZE, B., SHAH, V., REILLY, P.: Federation Proceedings 23, 64o (1964). zitiert nach PITTNER, W.: Strahlenempfindlichkeit in Abhängigkeit vom Zellzyklus. Inauguraldissertation, Düsseldorf (1971).

23. HUMPHREY, J. H., WHITE, R. G.: Kurzes Lehrbuch der Immunologie 3. Auflage Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1971).

24. KLEIN, H. O., LENNARTZ, K. J., GROSS, R., EDER, M., FISCHER, R.: In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen zur Zellkinetik und Synchronisation menschlicher Tumorzellen. Dtsch. med. Wschr. 97, 1273 (1972).

25. LOZZIO, B. B., MACHADO, E. A., CHERNOFF, A. I.: Functional and cellular alterations produced by phytohaemagglutinin. III. Hematologic findings in mice receiving PHA. Acta Haemat. (Basel) 41, 349 (1969).

26. MACHADO, E. A., LOZZIO, B. B.: Structural alterations after in vivo administration of phytohaemagglutinin. Nature 218, 268 (1968).

27. MORASCA, L.: Excerpta Med. Found 1o6, 5o (1966); zitiert nach FUSENIG, N. F., OBRECHT, P.: Der Wirkungsmechanismus der Vinca-Alkaloide. In: GMACHEL, E. (ed.):

Internationales Symposion über die Anwendung der Vinca-Alkaloide Velbe und Vincristin. (Urban & Schwarzenberg: München 1969), 141

28. NEUSS, N., GORMAN, M., BOAZ, H. E., CONE, H. J.: Vinca Alkaloids. XI. Structures of Leurocristine (LCR) and Vincaleucoblastine (VLB). J. Chem. Soc. 84, 1o16 (1962).

29. PAPPAS, A., SCHROTH, H.-J., OBERHAUSEN, E., SCHEURLEN, P. G.: In Vorbereitung

3o. PAPPAS, A., WOLFF, Chr., SCHROTH, H.-J., SCHEURLEN, P. G.: In Vorbereitung

31. PAPPAS, A., WOLFF, Chr., MORGENSTERN, E., SCHROTH, H.-J., SCHEURLEN, P. G., NEU, H.: Effects of purified phytohaemagglutinin on the lymphatic system in rats. Z. Immun.-Forsch. 144, 2oo (1972).

32. PAPPAS, A., TRAUB, A., SCHEURLEN, P. G.: Wirkung von Zytostatica auf die Lymphocyten-Transformation in vitro. In: Symposion über Aktuelle Probleme der Therapie maligner Tumoren. Münster/Westf., Oktober 1972 Springer Verlag, (im Druck).

33. PITTNER, W.: Strahlenempfindlichkeit in Abhängigkeit vom Zellzyklus. In vivo Untersuchungen am transplantierten Sarkom 180 mit 15 MeV Neutronen und ^{125}J-Deoxyuridin. Inauguraldissertation, Düsseldorf (1971).

34. RIGAS, D. A., JOHNSON, E. A., JONES, R. T., Mc DERMED, J. D., TISDALE, V. V.: The relationship of the molecular to the hemagglutinating and mitogenic activities of the phytohemagglutinin of phaseolus vulgaris. Journées Hellènes de Séparation immediate et chromatographie (IIIème J.I.S.I.C.) Athenes, 19. - 24. September 1965

Publication: Assotiation of Greek chimists 152, (1966).

35. RIGAS, D. A., OSGOOD, E. E.: Purfication and properties of the phytohemagglutinin of phaseolus vulgaris. J. Biol. Chimistry 212, 607 (1955).

36. SCARO, J.L., ALVAREZ-PRADD, R., CARRERA, M. A.: In vivo action of phyto-haemagglutinin on mouse erythropoiesis. (Summary) Rev. Esp. Fisiol. 27, 115 (1971).

37. SCHMIDT, C. G.: Cancerostase durch alkylierende Cytostatica und Tumorglykolyse in vivo. Klin. Wschr. 4, 188 (1967).

8. Anhang

Aufstellung der Versuchsgruppen und Zeitplan der Versuche

	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	o	+1	+2	+3	+4	+5
A (n=3)								u				ö	
B (n=2)								p/u				ö	
C 3 - 4								u					ö
C 1 - 2								p/u					ö
D 1 - 5 j								p/u					ö
D 6 - 9 j								u					ö
D 1o-13 j								p		u			ö
E 1 - 5 j		p						u				r/ö	
E 6 -1o j			p					u				r/ö	
E 11-15 j				p				u				r/ö	
E 16-2o j					p			u				r/ö	
E 21-25 j						p		u				r/ö	
E 26-3o j							p	u				r/ö	
E 31-35 j								p/u				r/ö	

Fortsetzung

	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	o	+1	+2	+3	+4	+5
E 36-4o j								u				r/ö	
F_1 1 -4o j	4 %ige NaJ-Lösung; die meisten Tiere starben nach PHA-Injektion												
F 1 -1o j				p				u				r/ö	
F 11-2o j					p			u				r/ö	
F 21-3o j						p		u				r/ö	
F 31-4o j							p	u				r/ö	
F 41-5o j								u				r/ö	
G 1 - 3 j	Tiere starben nach i.p. Injektion von ^{131}JDU												
H 1 -1o j								u					r/ö
H 11-2o j							v/u			e			r/ö
H 21-3o j								u	p	e			r/ö
H 31-4o j								u		e			r/ö
I 1 -1o j				v		e		u					r/ö
I 21-3o j						e		u					r/ö
I 11-2o j					p	e		u					r/ö

Fortsetzung

	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	o	+1	+2	+3	+4	+5
I 31-4o	j							u					r/ö

j = Natrium - Jodid ins Trinkwasser 2 %ig

p = Injektion von PHA 5 mg/kg Körpergewicht

u = Injektion von ^{131}JDU 5o nCi/g Körpergewicht

ö = Abtöten der Tiere

r = Entnahme von Organen

v = Injektion von VINCRISTIN ^{R} 25 % der LD_{5o}

e = Injektion von ENDOXAN ^{R} 25 % der LD_{5o}

L E B E N S L A U F

Am 13. August 1944 wurde ich, Hans-Joachim Schroth in Hermeskeil geboren. Meine Eltern sind die Eheleute Nikolaus Schroth und Margarethe Schroth geb. Becker, wohnhaft in Reinsfeld. Im Frühjahr 1951 wurde ich in die katholische Volksschule Reinsfeld eingeschult. 1959 besuchte ich nach bestandener Aufnahmeprüfung das Staatl. Aufbaugymnasium in Daun, wo ich am 14. Februar 1965 die Reifeprüfung bestand. Vom 1. April 1965 bis zum 31. März 1967 leistete ich meinen Wehrdienst bei einer Pioniereinheit und wurde am 31. März 1967 als Leutnant d. Reserve entlassen. Im Sommersemester 1967 studierte ich ein Semester Mathematik und Physik an der Universität des Saarlandes, Saarbrücken. Zum Wintersemester 1967/68 wechselte ich über zur Medizinischen Fakultät. Nach dem Wintersemester 1968/69 legte ich das Vorphysikum, nach dem Sommersemester 197o das Physikum ab. Zur Zeit befinde ich mich im sechsten klinischen Semester.

Herrn Prof. Dr. med. A. PAPPAS danke ich für die Einführung in den Themenkreis der Arbeit, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. E. OBERHAUSEN für die hilfreiche Unterstützung bei der Ausarbeitung der Methodik.
Mein Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. GLÖBEL, Herrn Dipl.-Physiker SCHNEIDER, Fräulein ROHR und Frau GERWERT für die ständige Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Versuche.
Herr M. BOSL fertigte in dankenswerter Weise die Abbildungen, meine Frau C. SCHROTH die Reinschrift dieser Arbeit.